# 中国境内不同地理型东方蜜蜂遗传多样性的 AFLP 分析

姜玉锁[1]，刘文忠[1]，张春香[1]，乔利英[1]，朱文进[2]，张桂贤[1]，郭传甲[1,*]

(1. 山西农业大学动物科技学院,山西太谷 030801;2. 河北科技师范学院动物科学系,河北昌黎 066600)

**摘要**:利用 22 对 AFLP 引物组合对我国 9 个省市的 11 个东方蜜蜂种群和 1 个西方蜜蜂种群的 39 个个体基因组 DNA 的遗传变异进行了研究;根据 AFLP 分析结果,采用 GeneScan3.0 软件、群体遗传数据分析包(Hickory v1.0.4)和群体遗传变异分析程序(AFLP-SURV 1.0),分别计算了 39 个个体间的遗传相似系数和各蜜蜂种群的 Nei's 遗传距离、Reynolds 遗传距离和成对的固定指数 $F_{st}$,并构建了各自的 UPGMA 聚类关系图。结果表明:AFLP 标记具有很高的多态检测效率,适合于蜜蜂种群遗传多样性分析和品种鉴定。蜜蜂种间的遗传分化明显,亲缘关系较远。中国境内不同地理型东方蜜蜂群体间存在着广泛的遗传变异。UPMGA 聚类关系图显示,海南东方蜜蜂由于长期的海岛隔离,已经形成了一个独特的类群,支持了通过形态学认定的海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种。

**关键词**:东方蜜蜂;西方蜜蜂;生态型;AFLP 分析;遗传多样性;中国

**中图分类号**:Q969 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2007)02-0144-09

# AFLP analysis of genetic diversity of *Apis cerana* Fabricius distributed in different geographic areas in China

JIANG Yu-Suo[1], LIU Wen-Zhong[1], ZHANG Chun-Xiang[1], QIAO Li-Ying[1], ZHU Wen-Jin[2], ZHANG Gui-Xian[1], GUO Chuan-Jia[1,*] (1. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Department of Animal Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600, China)

**Abstract**: The genetic variation and differentiation among 11 populations of *Apis cerana* Fabricius and one population of *Apis mellifera ligustica* Spinola from 9 provinces (cities) of China were analysed by a total of 22 AFLP primer combinations. The genetic similarity coefficients among 39 individuals, and Nei's distance, Reynolds distance, pairwise $F_{st}$ among the populations were calculated from AFLP data. Dendrogram trees among individuals and/or populations were constructed based on UPGMA clustering analysis. The results indicated that AFLP analysis had high assaying efficiency and provided a valuable tool for studying genetic diversity and breed characterization in honeybees. Remarkable genetic differentiation, indicated by the genetic similarity coefficients, was found between *A. cerana* and *A. mellifera*. Extensive genetic variation was also existed among the nine populations of *A. cerana*, indicating that *A. cerana* was rich in genetic diversity. The UPGMA tree suggested that the honeybees of Hainan province had evolved into a unique subspecies because of island isolation, which supported the results based on morphological research.

**Key words**: *Apis cerana*; *Apis mellifera*; ecotype; AFLP analysis; genetic diversity; China

中国境内的东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 分布于除新疆外的全国各省、市、自治区。目前,绝大部分地区的东方蜜蜂仍处于野生和半野生的状态,由于地理隔离和长期的自然选择,各地的东方蜜蜂在形态上都存在着一定的差异,形成了许多不同的生态型(ecotype)。自上世纪初西方蜜蜂 *Apis mellifera*

基金项目:山西省留办基金项目(2003051);山西省教育厅高校科技开发项目(200337)

作者简介:姜玉锁,男,1963 年生,山西万荣人,教授,博士,研究方向为动物分子系统发育学,Tel.:0354-6285990;E-mail:jiangys-001@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.:0354-6289295;E-mail:guochj695124@sohu.com

收稿日期 Received:2006-09-01;接受日期 Accepted:2006-12-05

L. 引进我国以来，由于东方蜜蜂在种间竞争上处于劣势，加之数十年来自然生态条件的不断恶化，其分布范围逐渐缩小，部分地区的野生种群减少到频危程度（杨冠煌，2005）。保存、保护和合理利用这一宝贵的蜂种资源势在必行。

到目前为止，国内外学者有关东方蜜蜂的亚种分化存在诸多争议，但大多是以地理分布、形态特征和生物学特性的鉴定为主要依据的（龚一飞和张其康，2000；杨冠煌，2001）。随着分子生物学技术的迅猛发展，采用分子遗传标记技术，从基因水平上揭示种及品种（地理亚种）间的遗传差异，为蜜蜂的分类研究提供更加准确、可靠的方法成为可能。

扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）是一种基于 PCR 和 RFLP 基础上的 DNA 指纹技术（Zabeau and Vos，1993）。因其兼有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性，且具有快速、灵敏、稳定，所需 DNA 量少，多态性丰富，重复性好，以及可以在对基因组序列一无所知的情况下进行研究等特点（张民照和康乐，2002），所以被认为是一种十分理想的、有效的、先进的分子标记，现已在昆虫遗传图谱的构建（Roos *et al*.，1998；Tan *et al*.，2001；朱玉芳等，2001）、基因标记及定位（万春玲等，2001；Tan *et al*.，2001）、种及种下阶元的分类鉴定（McMichael，1999；Cervera *et al*.，2000）、遗传多样性和系统发生（Semblat *et al*.，1998；Katiyar *et al*.，2000；张丽萍等，2004）等方面得到了较为广泛的应用。近年来，AFLP 技术也开始应用于蜜蜂的遗传多样性研究（Suazo and Hall，1999；Smith *et al*.，2003）。

本研究采用 AFLP 分子标记技术对来自我国 9 个省市的 11 个东方蜜蜂种群和 1 个西方蜜蜂种群共 12 个种群的 39 个个体的基因组 DNA 进行了分析；并结合地理分布和其它形态学、分子标记的研究结果，探讨蜜蜂不同种（群）间的遗传变异及其分化状况，以期为我国东方蜜蜂资源的保护与合理开发利用提供新的基础数据资料。

# 1　材料与方法

## 1.1　样本采集

本实验所用东方蜜蜂样本采自全国 9 个省市 11 个地点，除福建、江西和北京的样本取自人工饲养的标准蜂箱外，其他均为旧法饲养的自然蜂群。每个点采 1 ~ 5 群蜂不等，每群随机采蜂 50 ~ 100 只，放入无水乙醇（分析醇）中，置 –18℃的冰箱保存至 DNA 提取。西方蜜蜂意大利蜂采自山西农业大学动物科技学院实验蜂场。各种群的采样数量、采样地点及编号见表 1。

## 1.2　主要仪器和设备

小型台式离心机，美国 Beckman 公司；DG-Ⅱ暗箱式紫外透箱仪（鼎国自产）；DG-3D 大型水平电泳槽（鼎国自产）；DG-Ⅲ双稳数显电泳仪（鼎国自产）；Sigma 3K18 型低温冷冻离心机（Sigma，USA）；Gene Amp PCR System 9600（Perkin Elmer，USA）；ABI377 测序仪，PE 公司；Mill-Q 超纯水仪，美国 Milli-pore 公司。

## 1.3　试剂盒

AFLP 试剂盒（*Hin*dⅢ/*Mse*Ⅰ型），由北京鼎国生物技术有限公司提供。包括 DNA 提取系统、AFLP 核心试剂和 AFLP 引物。

## 1.4　方法

**1.4.1　基因组 DNA 提取**：DNA 提取采用北京鼎国生物技术有限公司的 DNA 提取试剂盒，每个地理种群取 4 群蜂，每群取 1 只蜜蜂，分别提取 DNA。提取的 DNA 用 TE 缓冲液稀释，0.8% 琼脂糖检测 DNA 纯度、完整性及产量，1 μL 电泳可见即可。

**1.4.2　AFLP 分析**：（1）模板 DNA 的酶切和接头连接：采用 *Hin*dⅢ和 *Mse*Ⅰ进行双酶切，酶切片段与 *Hin*dⅢ和 *Mse*Ⅰ接头连接。其接头序列分别为：*Hin*dⅢ接头：5′-CTCGTAGACCTGCGTACC-3′；3′-CATCTGGACGCATGGTCGA-5′。*Mse*Ⅰ接头：5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′；3′-TACTCAGGACTCAT-5′。

反应体系（20 μL）：DNA 模板 4 μL；Adapter 1 μL；*Hin*dⅢ/*Mse*Ⅰ 2 μL；10 × Reaction buffer 2.5 μL；10 mmol/L ATP 2.5 μL；T4 Ligase 1 μL；$ddH_2O$ 7 μL。

混匀离心数秒，37℃保温 5 h，8℃保温 4 h，4℃过夜。

（2）预扩增：采用 3′末端带 1 个选择性碱基的引物对酶切-连接产物进行预扩增，其预扩引物序列为：*Hin*dⅢ预扩引物序列：AGACTGCGTACCAGCTTA，*Mse*Ⅰ预扩引物序列：GATGAGTCCTGAGTAAC。

反应体系（25 μL）：模板 DNA 2 μL；Pre-ampmix 1 μL；dNTPs 0.5 μL；10 × PCR buffer 2.5 μL；Taq DNA polymerase 0.5 μL；$ddH_2O$ 18.5 μL。PCR 反应程序为：94℃预变性 2 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 80 s（循环 30 轮）；72℃延伸 5 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

(3)选择性扩增：预扩增产物用 AFLP-TE 按 1∶20 稀释后，用于选择性扩增。选择性扩增引物带有 3 个选择性碱基，按需要选取引物组合。选择性扩增引物序列如表 2 所示。

反应体系(25 μL)：预扩增稀释样品 2 μL；10×PCR buffer 2.5 μL；dNTPs 0.5 μL；*Hin*dⅢ 引物和 *Mse* Ⅰ 引物各 1 μL(共 8 种，按需要挑选一种)；Taq 酶 0.5 μL；AFLP-Water 17.5 μL。PCR 反应程序为：预变性 94℃ 2 min；第一轮扩增参数：94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 80 s；以后每轮循环退火温度递减 1℃，扩增 10 轮；接着按 94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 80 s 扩增 23 轮；延伸加时 72℃ 5 min。

**表 1 实验用蜜蜂样品采集信息**

**Table 1 List of honeybee samples for AFLP analysis**

| 种群 Population | 代码 Code | 采样地点 Location | 群数 Number of colonies | 采样方式 Sample collection |
|---|---|---|---|---|
| 海南东方蜜蜂 *A. c. hainana* | HN | 海南海口 Haikou, Hainan | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 福建东方蜜蜂 *A. c.* in Fujian | FJ | 福建福州 Fuzhou, Fujian | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 江西东方蜜蜂 *A. c.* in Jiangxi | JX | 江西南昌 Nanchang, Jiangxi | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 云南东方蜜蜂 *A. c.* in Yunnan | YN | 云南西双版纳 Xishuangbanna, Yunnan | 4 | 随机抽样 Random sampling |
| 四川东方蜜蜂 *A. c.* in Sichuan | SC | 四川宜宾 Yibin, Sichuan | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 甘肃东方蜜蜂 *A. c.* in Gansu | GS | 甘肃天水 Tianshui, Gansu | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 山西东方蜜蜂Ⅰ *A. c.* in Shanxi Ⅰ | SXⅠ | 山西沁水 Qinshui, Shanxi | 7 | 随机抽样 Random sampling |
| 山西东方蜜蜂Ⅱ *A. c.* in Shanxi Ⅱ | SXⅡ | 山西沁源 Qinyuan, Shanxi | 2 | 随机抽样 Random sampling |
| 北京东方蜜蜂 *A. c.* in Beijing | BJ | 北京房山 Fangshan, Beijing | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 吉林东方蜜蜂Ⅰ *A. c.* in Jilin Ⅰ | JLⅠ | 吉林桦甸 Huadian, Jilin | 5 | 随机抽样 Random sampling |
| 吉林东方蜜蜂Ⅱ *A. c.* in Jilin Ⅱ | JLⅡ | 吉林辉南 Huinan, Jilin | 3 | 随机抽样 Random sampling |
| 西方蜜蜂(意大利蜂亚种) *A. m. ligustica* | AM | 山西农业大学实验蜂场 Experimental Apiary of Shanxi Agricultural University | 5 | 随机抽样 Random sampling |

**表 2 选择性扩增中使用的引物**

**Table 2 Primers used in the selective amplification**

| *Hin*dⅢ引物序列(*Hin*dⅢ primer sequences) | *Mse* Ⅰ引物序列(*Mse* Ⅰ primer sequences) |
|---|---|
| H-1：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA AC | M-1：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA A |
| H-2：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA AG | M-2：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA C |
| H-3：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA CA | M-3：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA G |
| H-4：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA CT | M-4：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T |
| H-5：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA CC | M-5：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACT A |
| H-6：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA CG | M-6：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACT C |
| H-7：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA GC | M-7：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G |
| H-8：5′-AGA CTG CGT ACC AGC TTA GG | M-8：5′-GAT GAG TCC TGA GTA ACT T |

(4) 利用 ABI377 测序仪进行 AFLP-PCR 扩增产物的检测分析：用灭菌的 $ddH_2O$(Million Q)将 PCR 扩增产物稀释 20～30 倍，取 1.2 μL 的稀释产物，加入等量的上样缓冲液，再加入 0.3 μL 的分子量内标，上样前 94℃变性 3.5 min，取出后立即插入冰水混合物中。取 1.5 μL 变性的 PCR 产物用 4%的聚丙烯酰胺胶在 ABI377 序列分析仪上，2 400 V、32.9 mA 下电泳 2.5 h，收集图像。应用 GeneScan3.0 软件进行数据收集、泳道线校正、分子量内标校正和迁移片段大小测量。

### 1.5 数据遗传分析

**1.5.1 依据个体的相似系数构建 UPMGA 聚类关系图**：对通过测序仪进行图像收集和分析而精确计算出的片段大小，其误差在一个碱基范围内记为相同的带。对于每一引物组合而言，在特定位置出现扩增带记为“1”，否则为“0”，以此作为数据记录的标准。采用 GeneScan3.0 分析软件计算 39 个个体间的相似系数，并构建 UPMGA 聚类关系图。

多态性条带比例 = 多态性扩增片段数/扩增片段总数；

特异性条带比例 = 特异性条带数/扩增片段总数。

**1.5.2 依据群体遗传距离构建 UPMGA 聚类关系图**：（1）群体遗传数据分析：根据 Holsinger 等（2002）的贝叶斯方法，利用 Hickory v1.0.4 软件包（Holsinger and Lewis，2005）进行遗传分析，具体参数设定为：总链长 250 000 轮，其中预热 50 000 轮；稀疏间隔为 100。（2）AFLP 群体遗传分析：根据 Zhivotovsky（1999）的等位基因服从非均匀先验分布的贝叶斯法，利用 AFLP-SURV 1.0 软件（Vekemans，2002）进行群体样本的遗传多样性和群体遗传结构的估计。具体参数设定为：固定指数（$F_{st}$）检验重排数，1 000 轮；遗传距离自助数，1 000 轮。（3）系统发育分析：利用 Phylip 3.65 中的 Neighbor 程序进行系统发育树的构建。（4）系统发育树看图：利用 Treeview（Page，1996）显示和打印图像。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜蜂个体的选择性扩增结果

**2.1.1 扩增结果**：采用经汰选所获得的多态性好的 22 对引物组合，对我国境内 11 个东方蜜蜂种群及 1 个西方蜜蜂种群的 39 个个体的基因组 DNA 进行 AFLP 分析，共得到 44 297 条扩增带，平均每对引物组合扩增出 2 013.5 条带（各个体带数总和，下同）。引物组合及扩增带数见表 3。由表 3 可见，在所用的 22 对引物组合中，扩增带数最多的是 H3 和 M1，为 2 670 条；最少的是 H4 和 M2，为 1 175 条。引物组合 H4 和 M2 及 H4 和 M5 扩增效果较差，表现为条带数少且差异大。39 个个体总的多态性条带数为 42 388 条，多态性条带数比例是 95.69%；总的特异性条带数为 388 条，比例为 0.91%。引物组合中，有 6 对多态性条带比例达 100%（H2/M4，H5/M6，H5/M2，H4/M2，H4/M4，H4/M5），最低的是 H8 和 M3 组合，为 87.37%。

**表 3 22 对 AFLP 引物组合的扩增结果**

**Table 3 Amplification results of 22 AFLP primer combinations**

| 引物组合 Primer combinations | 扩增带数 Number of bands | 多态性带 Polymorphic bands | | 特异性带 Specific bands | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 数量 Number | 比例 Percent（%） | 数量 Number | 比例 Percent（%） |
| H1&M1 | 2 226 | 2 109 | 94.74 | 14 | 0.63 |
| H1&M2 | 2 279 | 2 162 | 94.87 | 16 | 0.70 |
| H1&M3 | 2 052 | 1 896 | 92.40 | 25 | 1.22 |
| H1&M5 | 2 156 | 1 961 | 90.96 | 19 | 0.88 |
| H2&M3 | 2 090 | 2 012 | 96.27 | 24 | 1.15 |
| H2&M4 | 1 784 | 1 784 | 100 | 21 | 1.18 |
| H3&M1 | 2 670 | 2 553 | 95.62 | 10 | 0.37 |
| H3&M4 | 2 365 | 2 209 | 93.40 | 14 | 0.59 |
| H3&M5 | 1 859 | 1 820 | 97.90 | 16 | 0.86 |
| H4&M2 | 1 175 | 1 175 | 100 | 22 | 1.87 |
| H4&M4 | 2 100 | 2 100 | 100 | 15 | 0.71 |
| H4&M5 | 1 561 | 1 561 | 100 | 9 | 0.58 |
| H4&M7 | 2 097 | 2 019 | 96.28 | 23 | 1.10 |
| H5&M2 | 2 030 | 2 030 | 100 | 15 | 0.74 |
| H5&M5 | 1 776 | 1 698 | 95.61 | 17 | 0.96 |
| H5&M6 | 2 135 | 2 135 | 100 | 25 | 1.17 |
| H5&M8 | 1 627 | 1 510 | 92.81 | 23 | 1.41 |
| H6&M3 | 2 006 | 1 928 | 96.11 | 17 | 0.85 |
| H7&M2 | 2 497 | 2 380 | 95.31 | 9 | 0.36 |
| H7&M4 | 1 563 | 1 407 | 90.02 | 25 | 1.60 |
| H7&M6 | 2 087 | 2 050 | 98.0 | 20 | 1.0 |
| H8&M3 | 2 162 | 1 889 | 87.37 | 9 | 0. 42 |
| 总计 Total | 44 297 | 42 388 | | 388 | |
| 平均值 Average | 2 013.6 | 1 926.7 | 95.69 | 17.6 | 0.91 |

**2.1.2 遗传相似性分析**:根据 22 种 AFLP 引物组合的检测结果,利用 GeneScan3.0 软件计算 12 个蜜蜂种群 39 个个体间的遗传相似系数,结果如表 4。从表 4 可以看出,不同地理型东方蜜蜂与西方蜜蜂个体间的遗传相似系数较低,最高的为 0.4555,最低的为 0.3621。不同地理型东方蜜蜂个体间以及西方蜜蜂个体间的遗传相似系数均较高。不同地理型东方蜜蜂个体间的遗传相似系数变化在 0.4161 ~ 0.8774 之间。值得注意的是,海南东方蜜蜂个体间的遗传相似系数均在 0.8200 以上,这说明海南的东方蜜蜂由于海岛隔离,经过长期的自然选择,形成了一个独特的类群。

**2.1.3 聚类分析**:根据遗传相似系数的计算结果,构建了 12 个蜜蜂种群 39 个个体的 UPGMA 聚类关系图(图 1)。如图 1 所示,同一个蜜蜂种群的各个体能较好地聚在一起。39 个个体明显地分为两大类群:西方蜜蜂单独聚为一大类群,而其他不同地理型东方蜜蜂聚为另一大类群。在东方蜜蜂这一大类群中,海南东方蜜蜂又单独聚为一个类群,其他地区东方蜜蜂聚为另一个类群。在这另一个类群中,南方的云南、四川和福建聚为一组,北方的甘肃、北京和吉林聚为一组,江西和山西的东方蜜蜂在两个组中均有。

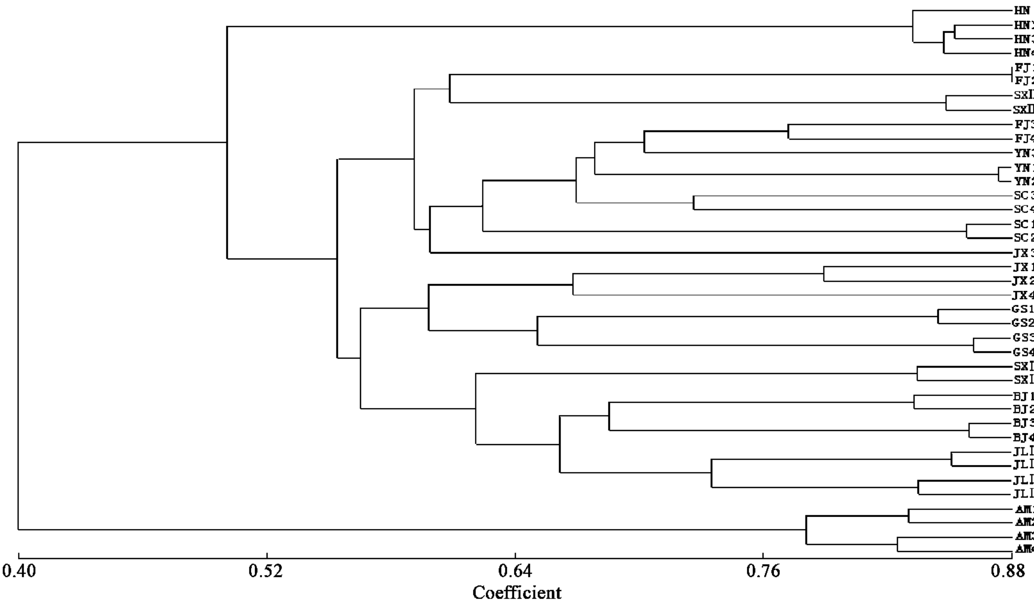


**图 1 12 个蜜蜂种群 39 个个体的 UPGMA 聚类关系图**

Fig. 1 UPGMA tree of 39 individuals from 12 honeybee populations

HN:**海南** Hainan;FJ:**福建** Fujian;JX:**江西** Jiangxi;YN:**云南** Yunnan;SC:**四川** Sichuan;GS:**甘肃** Gansu;SXⅠ:**山西沁水** Qinshui, Shanxi;SXⅡ:**山西沁源** Qinyuan, Shanxi;BJ:**北京** Beijing;JLⅠ:**吉林桦甸** Huadian, Jilin;JLⅡ:**吉林辉南** Huinan, Jilin;AM:**西方蜜蜂** *A. m. ligustica*. **缩写后的数字代表不同个体** The numbers following the abbreviations indicate different individuals. **下同** The same below.

## 2.2 蜜蜂种群的遗传多样性分析

采用群体遗传数据分析包 Hickory v1.0.4 和群体遗传变异分析程序 AFLP-SURV 1.0 对 12 个蜜蜂种群的遗传变异进行了分析,计算了它们间的 Nei's 遗传距离(Nei, 1987)、Reynolds 遗传距离(Reynolds *et al*., 1993)和成对的固定指数 $F_{st}$(Lynch *et al*., 1994)(表 5 ~ 7),并据此构建了各自的 UPGMA 聚类关系图(图 2)。

从表 5 可以看出,东方蜜蜂与西方蜜蜂的 Nei's 遗传距离较大,变化于 0.1287 ~ 0.2542 之间。除海南东方蜜蜂外,不同地理型东方蜜蜂种群间的Nei's 遗传距离均小于 0.1,变化于 0.0383 ~ 0.0983 之间。海南东方蜜蜂与其他地理型东方蜜蜂种群间的 Nei's遗传距离均大于 0.15,变化于 0.1531 ~ 0.2005。从表 6 可以看出,西方蜜蜂种群和我国境内不同地理型东方蜜蜂种群间的遗传距离均在 0.61 以上,海南东方蜜蜂与其他地理型东方蜜蜂种群间的遗传距离均在 0.58 以上,变化于 0.5804 ~ 0.8852;而其他地理型东方蜜蜂种群间的 Reynolds 遗传距离变化于 0.1784 ~ 0.5087。地理位置相距越远或相对封闭的东方蜜蜂种群间的遗传距离就大;相反就较小。

从表 7 可以看出,东方蜜蜂和西方蜜蜂种群间,以及海南东方蜜蜂与其他地理型东方蜜蜂种群间的固定指数均在 0.40 以上,说明蜜蜂不同种间,以及

表 4　12 个蜜蜂种群 39 个个体间遗传相似系数

Table 4　The genetic similarity coefficient among 39 individuals of 12 honeybee populations

| | HN1 | HN2 | HN3 | HN4 | FJ1 | FJ2 | FJ3 | FJ4 | JX1 | JX2 | JX3 | JX4 | YN1 | YN2 | YN3 | SC1 | SC2 | SC3 | SC4 | GS1 | GS2 | GS3 | GS4 | SXⅠ1 | SXⅠ2 | SXⅡ1 | SXⅡ2 | BJ1 | BJ2 | BJ3 | BJ4 | JLⅠ1 | JLⅠ2 | JLⅡ1 | JLⅡ2 | AM1 | AM2 | AM3 | AM4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HN1 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HN2 | 0.8403 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HN3 | 0.8201 | 0.8503 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HN4 | 0.8310 | 0.8454 | 0.8448 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FJ1 | 0.5330 | 0.5251 | 0.5294 | 0.5381 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FJ2 | 0.5405 | 0.5370 | 0.5342 | 0.5468 | 0.8774 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FJ3 | 0.5855 | 0.5697 | 0.5869 | 0.5960 | 0.6023 | 0.6151 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FJ4 | 0.5349 | 0.5253 | 0.5286 | 0.5348 | 0.5779 | 0.5835 | 0.7709 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JX1 | 0.4864 | 0.4768 | 0.4818 | 0.4913 | 0.5662 | 0.5721 | 0.6054 | 0.6216 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JX2 | 0.4969 | 0.4837 | 0.4960 | 0.5066 | 0.5888 | 0.5854 | 0.6045 | 0.6200 | 0.7878 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JX3 | 0.5119 | 0.5206 | 0.5138 | 0.5319 | 0.5582 | 0.5654 | 0.6172 | 0.6055 | 0.5348 | 0.5648 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JX4 | 0.4516 | 0.4438 | 0.4485 | 0.4562 | 0.5574 | 0.5593 | 0.5873 | 0.6052 | 0.6732 | 0.6639 | 0.5200 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YN1 | 0.5149 | 0.5130 | 0.5110 | 0.5281 | 0.6123 | 0.6151 | 0.6652 | 0.6563 | 0.6010 | 0.6227 | 0.5983 | 0.5856 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YN2 | 0.5365 | 0.5349 | 0.5339 | 0.5498 | 0.6156 | 0.6261 | 0.6772 | 0.6730 | 0.6007 | 0.6161 | 0.6085 | 0.5740 | 0.8714 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| YN3 | 0.5817 | 0.5679 | 0.5722 | 0.5852 | 0.6179 | 0.6183 | 0.7163 | 0.6890 | 0.6078 | 0.6214 | 0.5925 | 0.5905 | 0.6941 | 0.7064 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SC1 | 0.4297 | 0.4231 | 0.4374 | 0.4527 | 0.5591 | 0.5511 | 0.5861 | 0.5948 | 0.5370 | 0.5585 | 0.5704 | 0.5315 | 0.6378 | 0.6267 | 0.5798 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SC2 | 0.4442 | 0.4381 | 0.4492 | 0.4651 | 0.5518 | 0.5439 | 0.5975 | 0.6123 | 0.5462 | 0.5584 | 0.5732 | 0.5366 | 0.6417 | 0.6306 | 0.5861 | 0.8559 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SC3 | 0.5023 | 0.4915 | 0.5052 | 0.5131 | 0.5741 | 0.5749 | 0.6654 | 0.6610 | 0.5767 | 0.5750 | 0.6101 | 0.5688 | 0.6595 | 0.6569 | 0.6414 | 0.6842 | 0.6876 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SC4 | 0.5506 | 0.5310 | 0.5367 | 0.5473 | 0.5824 | 0.5930 | 0.7106 | 0.7045 | 0.6187 | 0.6363 | 0.6238 | 0.5998 | 0.6559 | 0.6737 | 0.6725 | 0.6363 | 0.6555 | 0.7261 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GS1 | 0.4455 | 0.4410 | 0.4465 | 0.4495 | 0.5178 | 0.5228 | 0.5809 | 0.5848 | 0.6253 | 0.6275 | 0.5084 | 0.6627 | 0.5704 | 0.5673 | 0.5740 | 0.5607 | 0.5654 | 0.5780 | 0.6081 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GS2 | 0.4443 | 0.4430 | 0.4484 | 0.4554 | 0.5254 | 0.5188 | 0.5709 | 0.5803 | 0.6255 | 0.6225 | 0.5090 | 0.6530 | 0.5796 | 0.5731 | 0.5842 | 0.5680 | 0.5641 | 0.5865 | 0.5957 | 0.8425 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GS3 | 0.4310 | 0.4161 | 0.4296 | 0.4279 | 0.4904 | 0.4819 | 0.5359 | 0.5498 | 0.5674 | 0.5604 | 0.4918 | 0.5852 | 0.5231 | 0.5103 | 0.5385 | 0.5146 | 0.5230 | 0.5443 | 0.5567 | 0.6595 | 0.6542 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GS4 | 0.4180 | 0.4189 | 0.4200 | 0.4225 | 0.4845 | 0.4732 | 0.5233 | 0.5374 | 0.5569 | 0.5381 | 0.4797 | 0.5714 | 0.5074 | 0.5048 | 0.5335 | 0.5065 | 0.5074 | 0.5336 | 0.5499 | 0.6509 | 0.6407 | 0.8591 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SXⅠ1 | 0.4637 | 0.4463 | 0.4539 | 0.4666 | 0.5244 | 0.5375 | 0.5508 | 0.5543 | 0.5691 | 0.5666 | 0.4727 | 0.6089 | 0.5412 | 0.5554 | 0.5766 | 0.4832 | 0.4899 | 0.5309 | 0.5645 | 0.5819 | 0.5772 | 0.5111 | 0.5179 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| SXⅠ2 | 0.4754 | 0.4600 | 0.4685 | 0.4758 | 0.5260 | 0.5347 | 0.5614 | 0.5617 | 0.5695 | 0.5602 | 0.4851 | 0.6090 | 0.5389 | 0.5578 | 0.5796 | 0.4879 | 0.4900 | 0.5379 | 0.5680 | 0.5878 | 0.5787 | 0.5145 | 0.5212 | 0.8325 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | | |
| SXⅡ1 | 0.5555 | 0.5556 | 0.5595 | 0.5718 | 0.6179 | 0.6182 | 0.6401 | 0.6026 | 0.5266 | 0.5403 | 0.5774 | 0.5196 | 0.6082 | 0.6397 | 0.6395 | 0.5546 | 0.5642 | 0.6040 | 0.6033 | 0.5226 | 0.5282 | 0.4819 | 0.4762 | 0.5518 | 0.5507 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | | |
| SXⅡ2 | 0.5431 | 0.5402 | 0.5552 | 0.5606 | 0.6006 | 0.6011 | 0.6184 | 0.5898 | 0.5283 | 0.5458 | 0.5736 | 0.5112 | 0.6087 | 0.6272 | 0.6335 | 0.5539 | 0.5712 | 0.5908 | 0.5820 | 0.5116 | 0.5202 | 0.4903 | 0.4872 | 0.5502 | 0.5465 | 0.8463 | 1.0000 | | | | | | | | | | | | |
| BJ1 | 0.5426 | 0.5305 | 0.5422 | 0.5477 | 0.5728 | 0.5829 | 0.6130 | 0.5929 | 0.5911 | 0.5915 | 0.5235 | 0.5699 | 0.5651 | 0.5859 | 0.6375 | 0.4881 | 0.4917 | 0.5586 | 0.5868 | 0.5536 | 0.5600 | 0.5005 | 0.5002 | 0.6281 | 0.6264 | 0.6021 | 0.5856 | 1.0000 | | | | | | | | | | | |
| BJ2 | 0.5334 | 0.5219 | 0.5270 | 0.5373 | 0.5739 | 0.5872 | 0.6167 | 0.5981 | 0.5946 | 0.5941 | 0.5144 | 0.5823 | 0.5678 | 0.5792 | 0.6239 | 0.4938 | 0.5069 | 0.5551 | 0.5893 | 0.5658 | 0.5657 | 0.5027 | 0.5064 | 0.6105 | 0.6186 | 0.5959 | 0.5735 | 0.8310 | 1.0000 | | | | | | | | | | |
| BJ3 | 0.5403 | 0.5259 | 0.5352 | 0.5408 | 0.5787 | 0.5787 | 0.6118 | 0.5824 | 0.5819 | 0.5921 | 0.5458 | 0.5537 | 0.5647 | 0.5821 | 0.6262 | 0.5031 | 0.5210 | 0.5678 | 0.5916 | 0.5519 | 0.5520 | 0.5134 | 0.5092 | 0.6122 | 0.6193 | 0.5993 | 0.6002 | 0.7022 | 0.6823 | 1.0000 | | | | | | | | | |
| BJ4 | 0.5310 | 0.5221 | 0.5245 | 0.5357 | 0.5841 | 0.5878 | 0.6188 | 0.5903 | 0.5901 | 0.6071 | 0.5371 | 0.5697 | 0.5767 | 0.5964 | 0.6300 | 0.5159 | 0.5368 | 0.5714 | 0.6006 | 0.5641 | 0.5727 | 0.5236 | 0.5164 | 0.6000 | 0.6065 | 0.5988 | 0.5906 | 0.6898 | 0.6677 | 0.8570 | 1.0000 | | | | | | | | |
| JLⅠ1 | 0.5093 | 0.4959 | 0.5000 | 0.5094 | 0.5613 | 0.5613 | 0.5972 | 0.5811 | 0.6228 | 0.6248 | 0.5109 | 0.6271 | 0.5594 | 0.5732 | 0.6126 | 0.4937 | 0.5074 | 0.5558 | 0.5987 | 0.5927 | 0.5884 | 0.5267 | 0.5338 | 0.6386 | 0.6367 | 0.5889 | 0.5748 | 0.6904 | 0.6833 | 0.6772 | 0.6866 | 1.0000 | | | | | | | |
| JLⅠ2 | 0.5103 | 0.4939 | 0.5065 | 0.5111 | 0.5612 | 0.5566 | 0.5823 | 0.5632 | 0.6057 | 0.6092 | 0.5130 | 0.5982 | 0.5557 | 0.5681 | 0.6015 | 0.4909 | 0.5017 | 0.5510 | 0.5989 | 0.5840 | 0.5896 | 0.5169 | 0.5188 | 0.6356 | 0.6364 | 0.5641 | 0.5662 | 0.6788 | 0.6729 | 0.6659 | 0.6686 | 0.8490 | 1.0000 | | | | | | |
| JLⅡ1 | 0.4960 | 0.4875 | 0.4937 | 0.4984 | 0.5504 | 0.5568 | 0.5752 | 0.5672 | 0.6183 | 0.6150 | 0.4965 | 0.6074 | 0.5686 | 0.5703 | 0.6017 | 0.5000 | 0.5038 | 0.5454 | 0.5741 | 0.5930 | 0.5825 | 0.5184 | 0.5267 | 0.6136 | 0.6345 | 0.5575 | 0.5538 | 0.6570 | 0.6472 | 0.6365 | 0.6381 | 0.7467 | 0.7301 | 1.0000 | | | | | |
| JLⅡ2 | 0.4998 | 0.4961 | 0.4975 | 0.5014 | 0.5534 | 0.5583 | 0.5944 | 0.5746 | 0.6197 | 0.6145 | 0.5100 | 0.6048 | 0.5722 | 0.5756 | 0.6129 | 0.4929 | 0.5041 | 0.5480 | 0.5984 | 0.5973 | 0.5867 | 0.5145 | 0.5208 | 0.6189 | 0.6199 | 0.5667 | 0.5520 | 0.6626 | 0.6462 | 0.6396 | 0.6463 | 0.7249 | 0.7359 | 0.8331 | 1.0000 | | | | |
| AM1 | 0.3839 | 0.3862 | 0.3868 | 0.3915 | 0.4053 | 0.3990 | 0.4233 | 0.3950 | 0.3792 | 0.4004 | 0.4040 | 0.3484 | 0.4027 | 0.4121 | 0.4183 | 0.4188 | 0.4105 | 0.4245 | 0.4328 | 0.3671 | 0.3711 | 0.3787 | 0.3655 | 0.3801 | 0.3919 | 0.4401 | 0.4392 | 0.4054 | 0.4112 | 0.4148 | 0.4325 | 0.4180 | 0.4116 | 0.4028 | 0.4050 | 1.0000 | | | |
| AM2 | 0.4034 | 0.3992 | 0.4038 | 0.4061 | 0.4161 | 0.4107 | 0.4374 | 0.4000 | 0.3900 | 0.3982 | 0.4228 | 0.3577 | 0.4132 | 0.4183 | 0.4266 | 0.4133 | 0.4145 | 0.4340 | 0.4417 | 0.3692 | 0.3807 | 0.3745 | 0.3737 | 0.3816 | 0.3919 | 0.4555 | 0.4501 | 0.4259 | 0.4330 | 0.4268 | 0.4387 | 0.4248 | 0.4224 | 0.4111 | 0.4173 | 0.8283 | 1.0000 | | |
| AM3 | 0.3890 | 0.3867 | 0.3903 | 0.3950 | 0.3977 | 0.3933 | 0.4329 | 0.4037 | 0.3841 | 0.4028 | 0.3984 | 0.3529 | 0.4101 | 0.4134 | 0.4157 | 0.4014 | 0.4108 | 0.4139 | 0.4225 | 0.3669 | 0.3719 | 0.3782 | 0.3701 | 0.3776 | 0.3892 | 0.4375 | 0.4348 | 0.4101 | 0.4233 | 0.3985 | 0.4158 | 0.4106 | 0.4071 | 0.4100 | 0.4113 | 0.7947 | 0.7922 | 1.0000 | |
| AM4 | 0.3949 | 0.3940 | 0.4061 | 0.4061 | 0.4058 | 0.3988 | 0.4297 | 0.4010 | 0.3767 | 0.4032 | 0.4055 | 0.3449 | 0.4082 | 0.4172 | 0.4264 | 0.4075 | 0.4143 | 0.4160 | 0.4404 | 0.3739 | 0.3742 | 0.3630 | 0.3621 | 0.3714 | 0.3848 | 0.4362 | 0.4438 | 0.4188 | 0.4248 | 0.4168 | 0.4257 | 0.4117 | 0.4101 | 0.4130 | 0.4017 | 0.7697 | 0.7609 | 0.8233 | 1.0000 |

表 5　12 个蜜蜂种群间的 Nei 氏遗传距离

Table 5　Nei's genetic distances among 12 honeybee populations

| | 海南 HN | 福建 FJ | 江西 JX | 云南 YN | 四川 SC | 甘肃 GS | 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/SXⅡ | 北京 BJ | 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/JLⅡ | 西方蜜蜂 AM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 海南 HN | | 0.1531 | 0.1691 | 0.1692 | 0.1802 | 0.2033 | 0.1666 | 0.1795 | 0.2005 | 0.2542 |
| 福建 FJ | 0.1531 | | 0.0394 | 0.0424 | 0.0446 | 0.0750 | 0.0519 | 0.0714 | 0.0846 | 0.1530 |
| 江西 JX | 0.1691 | 0.0394 | | 0.0496 | 0.0383 | 0.0390 | 0.0502 | 0.0655 | 0.0594 | 0.1335 |
| 云南 YN | 0.1692 | 0.0424 | 0.0496 | | 0.0464 | 0.0820 | 0.0601 | 0.0856 | 0.0938 | 0.1623 |
| 四川 SC | 0.1802 | 0.0446 | 0.0383 | 0.0464 | | 0.0570 | 0.0580 | 0.0890 | 0.0924 | 0.1287 |
| 甘肃 GS | 0.2033 | 0.0750 | 0.0390 | 0.0820 | 0.0570 | | 0.0679 | 0.0901 | 0.0815 | 0.1412 |
| 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/Ⅱ | 0.1666 | 0.0519 | 0.0502 | 0.0601 | 0.0580 | 0.0679 | | 0.0572 | 0.0634 | 0.1381 |
| 北京 BJ | 0.1795 | 0.0714 | 0.0655 | 0.0856 | 0.0890 | 0.0901 | 0.0572 | | 0.0520 | 0.1671 |
| 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/Ⅱ | 0.2005 | 0.0846 | 0.0594 | 0.0938 | 0.0924 | 0.0815 | 0.0634 | 0.0520 | | 0.1675 |
| 西方蜜蜂 AM | 0.2542 | 0.1530 | 0.1335 | 0.1623 | 0.1287 | 0.1412 | 0.1381 | 0.1671 | 0.1675 | |

表 6　12 个蜜蜂种群的 Reynolds 遗传距离

Table 6　Reynolds genetic distances among 12 honeybee populations

| | 海南 HN | 福建 FJ | 江西 JX | 云南 YN | 四川 SC | 甘肃 GS | 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/SXⅡ | 北京 BJ | 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/JLⅡ | 西方蜜蜂 AM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 海南 HN | | 0.5804 | 0.6525 | 0.7135 | 0.7757 | 0.8852 | 0.6120 | 0.6949 | 0.8138 | 1.0339 |
| 福建 FJ | 0.5804 | | 0.1784 | 0.2117 | 0.2331 | 0.3837 | 0.2142 | 0.3062 | 0.3874 | 0.6664 |
| 江西 JX | 0.6525 | 0.1784 | | 0.2565 | 0.2161 | 0.2370 | 0.2197 | 0.3007 | 0.3072 | 0.6412 |
| 云南 YN | 0.7135 | 0.2117 | 0.2565 | | 0.2846 | 0.4849 | 0.2838 | 0.4126 | 0.4900 | 0.8058 |
| 四川 SC | 0.7757 | 0.2331 | 0.2161 | 0.2846 | | 0.3853 | 0.2891 | 0.4460 | 0.5087 | 0.7281 |
| 甘肃 GS | 0.8852 | 0.3837 | 0.2370 | 0.4849 | 0.3853 | | 0.3522 | 0.4810 | 0.4969 | 0.8294 |
| 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/Ⅱ | 0.6120 | 0.2142 | 0.2197 | 0.2838 | 0.2891 | 0.3522 | | 0.2525 | 0.3048 | 0.6179 |
| 北京 BJ | 0.6949 | 0.3062 | 0.3007 | 0.4126 | 0.4460 | 0.4810 | 0.2525 | | 0.2823 | 0.7635 |
| 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/Ⅱ | 0.8138 | 0.3874 | 0.3072 | 0.4900 | 0.5087 | 0.4969 | 0.3048 | 0.2823 | | 0.8437 |
| 西方蜜蜂 AM | 1.0339 | 0.6664 | 0.6412 | 0.8058 | 0.7281 | 0.8294 | 0.6179 | 0.7635 | 0.8437 | |

表 7　12 个蜜蜂种群的成对固定指数

Table 7　Pairwise $F_{st}$ among 12 honeybee populations

| | 海南 HN | 福建 FJ | 江西 JX | 云南 YN | 四川 SC | 甘肃 GS | 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/SXⅡ | 北京 BJ | 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/JLⅡ | 西方蜜蜂 AM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 海南 HN | | 0.4403 | 0.4793 | 0.5101 | 0.5396 | 0.5874 | 0.4577 | 0.5009 | 0.5568 | 0.6444 |
| 福建 FJ | 0.4403 | | 0.1634 | 0.1908 | 0.2079 | 0.3186 | 0.1928 | 0.2638 | 0.3212 | 0.4864 |
| 江西 JX | 0.4793 | 0.1634 | | 0.2262 | 0.1943 | 0.2110 | 0.1972 | 0.2597 | 0.2645 | 0.4734 |
| 云南 YN | 0.5101 | 0.1908 | 0.2262 | | 0.2477 | 0.3842 | 0.2471 | 0.3380 | 0.3874 | 0.5533 |
| 四川 SC | 0.5396 | 0.2079 | 0.1943 | 0.2477 | | 0.3197 | 0.2511 | 0.3598 | 0.3987 | 0.5172 |
| 甘肃 GS | 0.5874 | 0.3186 | 0.2110 | 0.3842 | 0.3197 | | 0.2968 | 0.3819 | 0.3916 | 0.5637 |
| 山西Ⅰ/Ⅱ SXⅠ/Ⅱ | 0.4577 | 0.1928 | 0.1972 | 0.2471 | 0.2511 | 0.2968 | | 0.2231 | 0.2627 | 0.4609 |
| 北京 BJ | 0.5009 | 0.2638 | 0.2597 | 0.3380 | 0.3598 | 0.3819 | 0.2231 | | 0.2460 | 0.5340 |
| 吉林Ⅰ/Ⅱ JLⅠ/Ⅱ | 0.5568 | 0.3212 | 0.2645 | 0.3874 | 0.3987 | 0.3916 | 0.2627 | 0.2460 | | 0.5699 |
| 西方蜜蜂 AM | 0.6444 | 0.4864 | 0.4734 | 0.5533 | 0.5172 | 0.5637 | 0.4609 | 0.5340 | 0.5699 | |

海南东方蜜蜂与其他地理型东方蜜蜂种群间的分化程度很大。其他地理型东方蜜蜂种群间的固定指数变化于 0.1634 ~ 0.3987，说明种群间分化程度较大或很大。地理位置相距越远，种群间的固定指数就越大；如吉林东方蜜蜂，除了与北京东方蜜蜂种群间的固定指数小于 0.25，与其他地理型东方蜜蜂种群间的固定指数均大于 0.26。

聚类分析表明，通过三种遗传距离所构建的聚类关系图基本相似，即西方蜜蜂种群和海南东方蜜蜂种群各为一个分支；其他地理型东方蜜蜂种群中，北京和吉林聚为一类，四川和江西逐级与福建、云南、山西、甘肃的种群聚为一类。

## 3　讨论和结论

### 3.1　AFLP 标记与种群遗传多样性分析

从本实验的结果看，AFLP 具有很高的多态检测效率，这主要是由于它在一次 PCR 扩增中能检测

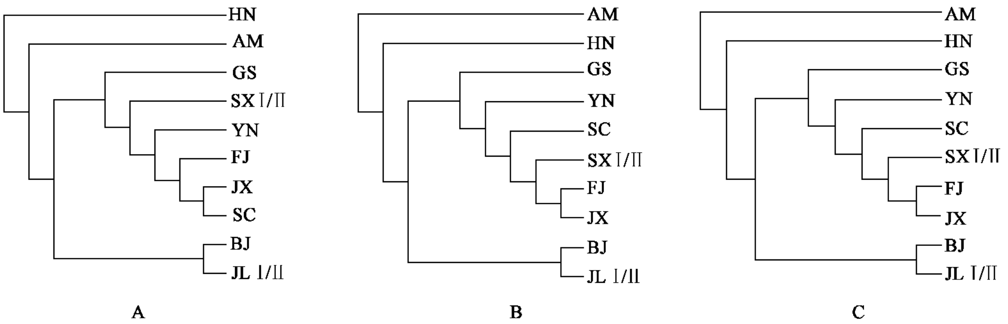


**图 2　基于 Nei 's 遗传距离(A)、Reynolds 遗传距离(B)和成对 $F_{st}$(C)所构建的 12 个蜜蜂种群的 UPGMA 聚类图**

Fig. 2　UPGMA trees among 12 honeybee populations based on Nei 's (A), Reynolds genetic distances (B) and pairwise $F_{st}$(C)

到大量的多态位点。本研究中平均每个引物组合总的多态性条带比例达 96.59%。农作物和动物的遗传多样性分析表明，AFLP 的多态检测效率明显优于 RFLP、RAPD 和微卫星等分子标记系统(Russell *et al*.，1997；Ajmone *et al*.，1997；李连城等，2000)。AFLP 具有检测位点多、多态水平高、无需了解基因组序列的特点使其在蜜蜂种群遗传多样性检测方面独具优势，尤其是对于仍处于野生或半野生状态的亚洲穴居蜜蜂的遗传分析，AFLP 标记提供了一种快速而有效的方法。

## 3.2　蜜蜂个体遗传多样性

本研究发现，我国境内不同地理型东方蜜蜂个体间的遗传相似性较低，遗传差异较大，其遗传相似系数变化于 0.4161～0.8774 之间。同一地理型东方蜜蜂个体间的遗传相似系数较高，其中海南东方蜜蜂个体间的遗传相似系数均在 0.8200 以上，超过了西方蜜蜂个体间的遗传相似系数，说明海南东方蜜蜂由于海岛隔离，经长期自然选择形成了一个独特的类群。

本实验的结论支持了通过形态学所确定的海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种的结论，但对将云南南部的东方蜜蜂确定为印度亚种(龚一飞等，2000；杨冠煌，2001；谭肯，2001)，本研究的结果并未予以肯定。按照 Ruttner(1988)对东方蜜蜂各亚种的界定，中华蜜蜂的分布范围包括中国、阿富汗、巴基斯坦、北越和北印度。这与我国学者通过形态学和线粒体 DNA 分析所得出的结论是相矛盾的。从地理分布上看，华南沿海至云南南部地区间并无不可逾越的天然屏障，且野生东方蜜蜂的种群数量大，基因交流应该说是比较频繁的，将其定为华南型(两广型)似更合适。由于本研究仅在争议地采集了 4 群东方蜜蜂的样本，也没有相邻国家相关的数据作参考，因此关于云南南部东方蜜蜂的亚种定位问题还有待进一步的研究和证实。

## 3.3　种群遗传多样性

采用群体遗传数据分析软件和群体遗传变异分析程序，利用贝叶斯方法所得数据(包括 Nei 's 遗传距离、Reynolds 遗传距离和成对固定指数($F_{st}$)构建的聚类关系图基本是一致的，即西方蜜蜂和海南东方蜜蜂各单独为一个类群，其他地理型东方蜜蜂为一大类群。

固定指数($F_{st}$)是衡量群体再分效应，表示因遗传漂变引起一个亚群的杂合度的降低程度。$F_{st}$ 的取值范围在 0～1 之间，其中 0 表示完全随机交配，无群体再分；1 表示极端再分，即群体隔离。0.00～0.05：群体分化程度较小；0.05～0.15：群体分化程度中等；0.15～0.25：群体分化程度较大；0.25～1.00：群体分化程度很大。从本试验的结果看，东方蜜蜂和西方蜜蜂的群体分化程度很大($F_{st}$ 在 0.4609～0.6444 之间)；海南东方蜜蜂与其他地理型东方蜜蜂的群体分化程度很大($F_{st}$ 在 0.4403～0.5874 之间)；其他地理型东方蜜蜂的群体分化程度较大或很大($F_{st}$ 在 0.1634～0.3987 之间)。这说明我国境内不同地理型东方蜜蜂群体分化程度是大的，地理距离相对越远，分化程度越大，其中海南东方蜜蜂由于长期的海岛隔离已经形成了一个独特的类群，从分子水平上证明，海南东方蜜蜂为东方蜜蜂的一个新亚种。

**致谢**　本实验用东方蜜蜂样本在采集过程中，得到了周冰峰、许正鼎、曾志将、陈东海、缪正瀛、林尊诚、高景林等原福建农林大学蜂学院校友的热情支持和帮助，在此表示衷心的感谢！

## 参 考 文 献 (References)

Ajmone-Marson P, Valentini AG, Bertoni G, Valentini A, Cassandro M,

Kuiper M，1997．AFLPTM marker for DNA fingerprinting in cattle．*Animal Genetics*，28：418－426．

Cervera MT，Cabezas JA，Simon B，Martinez-Zapater JM，Beitia F，Cenis JL，2000．Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci*（Hemiptera：Aleyrodidae）based on AFLP analysis．*Bull*．*Entomol*．*Res*．，90（5）：391－396．

Gong YF，Zhang QK，2000．Taxonomy and Evolution of Honeybees．Fuzhou：Fujian Science and Technology Press．69 pp．［龚一飞，张其康，2000．蜜蜂分类与进化．福州：福建科学技术出版社．69 页］

Holsinger KE，Lewis PO，2005．Hickory：A Package for Analysis of Population Genetic Data．Department of Ecology and Evolutionary Biology，U-3043，University of Connecticut，Storrs，CT．41 pp．

Holsinger KE，Lewis PO，Dey DK，2002．A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data．*Mol*．*Ecol*．，11：1 157－1 164．

Katiyar SK，Chandel G，Tan Y，Zhang Y，Huang B，Nugaliyadde L，Fernando K，Bentur JS，Inthavong S，Constantino S，Bennett J，2000．Biodiversity of Asian rice gall midge（*Orseolia oryzae* Wood Mason）from five countries examined by AFLP analysis．*Genome*，43（2）：322－332．

Lynch M，Milligan BG，1994．Analysis of population genetic structure with RAPD markers．*Molecular Ecology*，3：91－99．

McMichael M，Prowell DP，1999．Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm（Lepidoptera：Noctudiae）host strains．*Ann*．*Entomol*．*Soc*．*Amer*．，92：175－181．

Nei M，1987．Molecular Evolutionary Genetics．Columbia University Press，New York．512 pp．

Page RDM，1996．Treeview：An application to display phylogenetic trees on personal computers．*Comp*．*Appl*．*Biosci*．，12：357－358．

Reynolds J，Weir BS，Cockerham CC，1993．Estimation of the coancestry coefficient：basis for a short-term genetic distance．*Genetics*，105：767－779．

Roos MH，Hoekstra R，Plas ME，Otsen M，Lenstra JA，1998．Polymorphic DNA markers in the genome of parasitic nematodes．*J*．*Helminthol*．，72（4）：291－294．

Russel J，Fuller R，Fuller JD，Macaulay M，Hatz BG，Jahoor A，Powell W，Waugh R，1997．Drect comparison of levels of genetic variation among barely accessions detected by RFLPs，AFLPs，SSRs and RAPDs．*Theor*．*Appl*．*Genet*．，95：714－722．

Ruttner F，1988．Biogeography and Taxonomy of Honeybees．Springer Verlag：Berlin，Heidelberg，New York．282 pp．

Semblat JP，Wajnberg E，Dalmasso A，Abad P，Castagnone P，1998．High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis．*Mol*．*Ecol*．，7（1）：119－125．

Smith DR，Palmer MR，Otis G，Damus M，2003．Mitochondrial DNA and AFLP markers support species status of *Apis nigrocincta*．*Insectes Soc*．，50：185－190．

Suazo A，Hall HG，1999．Modification of the AFLP protocol applied to honey bee（*Apis mellifera* L.）DNA．*Biotechniques*，26（4）：704－705，708－709．

Tan K，2001．Study on Morphological and mtDNA Variation of *Apis cerana* in Yunnan．PhD Dissertation，Yunnan University．108 pp．［谭垦，2001．云南东方蜜蜂的形态学与 mtDNA 变异性研究．云南大学博士论文．108 页］

Tan YD，Wan C，Zhu Y，Lu C，Xiang Z，Deng HW，2001．An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm．*Genetics*，157（3）：1 277－1 284．

Vekemans X，2002．AFLP-SURV 1.0：A Program for Genetic Diversity Analysis with AFLP（and RAPD）Population Data．Laboratoire de Génétique et Ecologie Végetale，Unversité Libre de Bruxelles，Belgium．15 pp．

Wan CL，Tan YD，Zhu YF，He YY，Lu C，Zhou ZY，Xiang ZH，2001．Construction of molecular map of the silkworm（*Bombyx mori* L.）using AFLP markers．*Scientia Agricultura Sinica*，34（3）：338－341．［万春玲，谭远德，朱玉芳，贺一原，鲁成，周择杨，向仲怀，2001．利用 AFLP 标记构建家蚕分子连锁图谱．中国农业科学，34（3）：338－341］

Yang GH，2001．Chinese Honeybee．Beijing：China Agricultural Scientech Press．264 pp．［杨冠煌，2000．中华蜜蜂．北京：中国农业科技出版社．264 页］

Yang GH，2005．Harm of introducing the western honeybee *Apis mellifera* L. to the Chinese honeybee *Apis cerana* F. and its ecological impact．*Acta Entomologica Sinica*，48（3）：401－406．［杨冠煌，2005．引入西方蜜蜂对中蜂的危害及生态影响．昆虫学报，48（3）：401－406］

Li LC，Peng ZB，Liu XZ，Khairallah M，Zhang SH，Li XH，Fu JH，Warburton M，Yuan LX，2000．Comparison of Genetic Diversity among Maize Inbred Lines Based on RFLPs，SSRs，AFLPs and RAPDs．*Acta Genetica Sinica*，27（8）：725－733．［李连城，彭泽斌，袁力行，刘新芝，傅骏骅，张世煌，Warburton M，李新海，2000．利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究．遗传学报，27（8）：725－733］

Zabeau M，Vos P，1993．Selective Restriction Fragment Amplification：A General Method for DNA Fingerprinting．European Patent Application Number：92402629.7；Publication Number：0534 858AI．

Zhang MZ，Kang L，2002．Amplified fragment length polymorphism（AFLP）and its applications in entomological research．*Acta Entomologica Sinica*，45（4）：538－543．［张民照，康乐，2002．AFLP 标记的特点及其在昆虫学研究中的应用．昆虫学报，45（4）：538－548］

Zhang LP，Zhang YJ，Zhang WJ，Xu BY，Wu QJ，Xiao LF，Zhu GR，2004．Genetic differentiation in the thiamethoxam-resistant strain of *Bemisia tabaci* B-biotype．*Acta Entomologica Sinica*，47（6）：754－759．［张丽萍，张友军，张文吉，徐宝云，吴青君，肖利峰，朱国仁，2004．B 型烟粉虱抗噻虫嗪品系的遗传分化．昆虫学报，47（6）：754－759］

Zhivotovsky LA，1999．Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers．*Mol*．*Ecol*．，8：907－913．

Zhu YF，Tan YD，Wan CL，Lu C，He YY，Zhou YZ，Xiang ZH，2001．Construction of AFLP linkage map of the silkworm（*Bombyx mori*）．*Acta Entomologica Sinica*，44（4）：483－493．［朱玉芳，谭远德，万春玲，鲁成，贺一原，周泽扬，向仲怀，2001．家蚕 AFLP 连锁框架图谱的构建．昆虫学报，44（4）：483－493］

（责任编辑：袁德成）